13-01

腸内細菌遺伝子検出キット
-マルチ PCR-

(Code No. FIK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4849K

ー 目 次 ー

ご注意

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

本製品は、食中毒原因菌として知られるサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌をマルチプレックス PCR 法により検出するキットです。本製品を用いることにより、50 個の検便検体をプールした場合でも培養法と同等以上の感度でこれらの菌種を検出することが可能です。

プール・マルチプレックス PCR 法による検便検査のスクリーニングのご提案

サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌による食中毒予防のため、大量調理施設では調理従事者を対象とした検便検査を定期的に行うことが義務づけられています。調理従事者などを対象とする健康保菌者の抽出を目的とした検便検査の場合、その陽性率は 0.1%以下であり、大部分が陰性です。このような場合、検体をプールしてスクリーニングを行い、大部分の陰性検体をまとめて判定することが有効です。スクリーニングで陽性となったプールについて個別の検体を培養法で検査し、陽性検体を判定します。検体をプールすると、陽性検体は陰性検体により希釈されますが、本製品を用いることにより、50 個までのプール検体であれば、培養法と同等以上の感度で検出することが可能であり（文献 1）、検査の精度に影響を及ぼしません。

（文献 1） 荒川ら,日食微誌,29 101−107 (2012)

プール・マルチプレックス PCR 法を行う利点

(1)検査当日に 90～95%程度の陰性検体を判定できます。

本製品を用いた**プール・マルチプレックス PCR 法**での陰性率は 90～95%程度です。スクリーニングは数時間で完了し、検査当日に陰性を判定することができます。陽性となったプールに含まれる検体を個別に培養法で検査し陽性検体を判定します。

(2)塗沫培養の検体数を 10 分の 1 以下に低減できます。

プール・マルチプレックス PCR 法で 90～95%程度の陰性検体を判定できるので、培養法の検体数を約 10 分の 1 以下に低減できます。

(3)判定が簡便になります。

プール・マルチプレックス PCR 法の判定は PCR 増幅産物を電気泳動で数値化して行います。コロニーの色や形状による判定に比べ簡便に行えます。

ご注意

(1)本製品を診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。

(2)本製品を用いてスクリーニングを行う際の検体のプール数の上限は 50 検体です。この検体数上限は本製品の検出感度をもとに最適化されたものです。50 検体を超えるプール数でのスクリーニングは行わないでください。

(3)本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を順守し、必要に応じて適切な保護具をご使用いただきますようお願いいたします。

[2] 本製品に含まれるもの

品名	ラベルの色	容量	本数	保存温度
2x PCR Master Mix	青	1ml	5 本	-20℃
10x Primer Mix	緑	1ml	1 本	-20℃
UNG(Uracil-DNA Glycosylase）	灰	200μl	1 本	-20℃

[3] ご用意いただくもの

品名	推奨仕様
ヒートブロック	1.5ml チューブを 95℃以上の加熱処理が可能なもの
遠心分離機	12,000rpm が可能なもの
サーマルサイクラー	
電気泳動装置	島津製作所 MultiNA
電気泳動装置消耗品	島津製作所 MultiNA 用試薬 DNA-1000 SYBR® Gold
100bp ラダーマーカー	東洋紡（Code:DNA-035） ※滅菌水で 3 倍希釈してからご使用下さい
滅菌蒸留水	
1.5ml チューブ	
0.2mlPCR チューブまたはプレート	
滅菌竹串	
20ml チューブ	キャップつきのもの

※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です

[4] 検出される菌種と検出される遺伝子

菌種	遺伝子	備考
サルモネラ	invA	血清型の判定はできません
腸管出血性大腸菌	VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	血清型の判定はできません
赤痢菌	ipaH	ipaH をもつ腸管侵入性大腸菌も検出します

[5] キャリーオーバー汚染について

（1）キャリーオーバー汚染とは：

・PCR で生成した増幅産物が次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことです。

・混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こり、誤って陽性と判定（偽陽性）することになります。

（2）キャリーオーバー汚染の症状：

以下のような現象が観察される場合、キャリーオーバー汚染が疑われます。

・陽性となる検体の比率が異常に多い。

・多くの検体で同じ大きさの非特異的増幅によるバンドが観察される。

・内部標準のバンドも含め、バンドがまったく観察されない。

（3）キャリーオーバー汚染を回避するためには：

・反応液の調製と電気泳動とは別の作業区域で行ってください。電気泳動装置周辺は PCR 増幅産物が存在しキャリーオーバー汚染する可能性が高くなっています。

・反応液の調製および電気泳動作業時には、グローブ等を着用し、ピペット、チップ（フィルター付を推奨します）は反応液調製用、電気泳動用を区別して専用の物をご使用ください。

・チューブ開閉時には飛沫が飛び跳ねない様にご注意ください。

（4）さらなる対策として：

・本製品では PCR で dTTP にかわって dUTP を使用し増幅産物を合成します。また、反応液にウラシル DNA グリコシラーゼ（UNG）を添加します。

・UNG は dUTP を含んで合成された PCR 増幅産物を分解しますが、dTTP のみを含む天然の DNA を分解しません。

・キャリーオーバー汚染が起こった場合でも、反応液に添加した UNG が PCR 増幅産物を分解するので、偽陽性を回避できます。

（5）UNG の処理能力には限界があります：

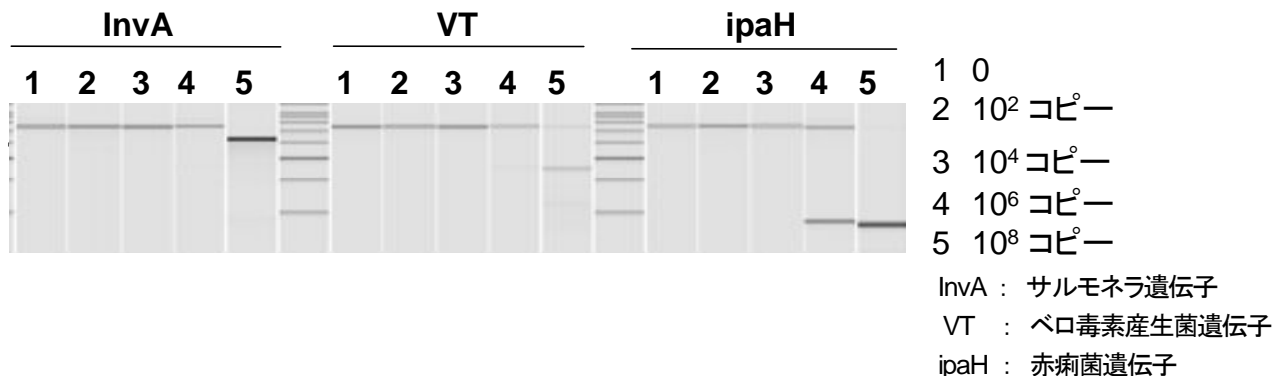
・反応液に添加できる UNG の量に限界があるため、UNG の処理能力には限界があります。本製品ではおよそ 10^4～10^6 コピー/反応までの増幅産物を消去可能です。（下記実施例を参照ください。）キャリーオーバー汚染を起こさないよう、細心の注意を払って作業してください。

<u>各種のコピー数を含む人工キャリーオーバーサンプルからの検出</u>

下記表に記載のコピー数(コピー/反応)のキャリーオーバー汚染を含む反応液を作製し、それぞれ検出を行いました。その結果、ipaH では 10^4 コピー、invA および VT では 10^6 コピーのキャリーオーバー汚染を消去することが可能でした。

InvA ： サルモネラ遺伝子

VT ： ベロ毒素産生菌遺伝子

ipaH ： 赤痢菌遺伝子

[6] 使用方法

糞便検体はキャリブレア培地採便管に採取されたものを使用します。

（1）糞便検体の懸濁液の作製：

下記　A, B いずれかの方法でプール懸濁液を作製します。

A　検体ごとに懸濁液を作製してからプールする方法

1) 1.5ml チューブに滅菌水 50µl をとります。
2) 採便管から採便棒を抜き、チューブに浸し、1-2 秒激しくボルテックスします。
3) 懸濁液を 10µl ずつ 50 本分プールします。（糞便検体を直接プールしないでください）

B ひとつの液に多数の糞便検体を懸濁してプールする方法

1) 20ml チューブに滅菌水 2.5ml をとります。
2) 採便管から採便棒を抜き、採便管に竹串を挿し、2-3 回上下します。
3) 竹串をチューブに挿し、2-3 回上下します。
4) 50 個の検体について、新しい竹串を使いながらひとつのチューブに懸濁していきます。
5) チューブにふたをし、2-3 回転倒混和します。
6) 0.5ml を新しい 1.5ml チューブに移します。

（2）加熱処理、遠心分離

1) 1.5ml チューブに入った懸濁液（プールした懸濁液）を 95℃ 5min 加熱します。
2) 12,000rpm X 3 分間 遠心分離します。
3) 遠心上清 2µl を処理済懸濁液として使用します。

- 加熱処理済懸濁液は PCR 反応液を調製するまでは 4℃以下で保存してください。
- 作製当日に PCR を行わない場合は凍結してください。数日間凍結保存可能ですが、お早めにご使用ください。
- 加熱処理をしていない懸濁液は保存できません。

（3）PCR 反応液の調製

各試薬について反応液を調製する前に

1) 凍結している場合は完全に融解します。
2) 泡立たない様にしながら十分攪拌します。
3) 軽くスピンダウンしてキャップの裏についている試薬を落とします。
4) １反応あたり以下の分量で混合します。反応数が多いときは、処理済懸濁液以外のマスターミックスを作製し、18µl ずつ分注した後、各懸濁液を添加します。

	使用量	備考
滅菌蒸留水	5.6 µl	
2x PCR Master Mix	10.0 µl	使用前に十分に撹拌してください
10x Primer Mix	2.0 µl	使用前に十分に撹拌してください
UNG	0.4 µl	
処理済懸濁液	2.0 µl	
合計	20.0 µl	

（4）PCR

サーマルサイクラーにて以下の温度・時間条件で反応します。

UNG 反応	20℃, 10分	
プレ変性：	95℃, 2分	
変性：	94℃, 10秒	10サイクル
会合:	57℃, 30秒	
伸長:	68℃, 30秒	
変性：	94℃, 10秒	15サイクル
会合:	55℃, 30秒	
伸長:	68℃, 30秒	
変性：	94℃, 10秒	20サイクル
会合:	53℃, 30秒	
伸長:	68℃, 30秒	

反応終了後の反応液は4℃で１週間程度安定です。長期にわたって保存する場合は－20℃で保存します。

（5）電気泳動

・マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA（島津製作所製）で電気泳動を行います。
・装置の取り扱い説明書に従って操作してください。
・PCR 終了後は、装置の上でチューブのふたを開けてください。
・電気泳動終了後は、装置の上でチューブにふたをして廃棄してください。
・DNA ラダーマーカーは東洋紡製　100bp　DNA Ladder（製品コード　DNA-035 ）を滅菌水で 3 倍に希釈したものを使用してください。

（6）電気泳動の判定、検査結果

・マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA（島津製作所製）を使用したシグナルの判定基準を示します。
・以下の増幅断片長およびシグナル強度の両方の条件を満たした場合、その項目について陽性と判定します。

項目		陽性条件
内部標準	増幅断片長	685 - 735
	シグナル強度	5 mV 以上
サルモネラ	増幅断片長	610 - 655
	シグナル強度	7 mV 以上
ベロ毒素産生菌	増幅断片長	430 - 480
	シグナル強度	2mV 以上
赤痢菌	増幅断片長	260 - 290
	シグナル強度	2 mV 以上

・検査結果

内部標準	サルモネラ ベロ毒素産生菌 赤痢菌	検査結果と処置
陽性	陰性	サルモネラ、ベロ毒素産生菌、赤痢菌について陰性 ここで検査は終了します。
陽性	陽性	当該菌種について陽性 プールに含まれる個々の検体を塗抹培養します。
陰性	陽性	当該菌種について陽性 検出対象遺伝子の増幅が優勢で、内部標準の増幅が確認できない場合があります。この場合は陽性と判定します。 プールに含まれる個々の検体を塗抹培養します。
陰性	陰性	判定不能 （反応が進行していません） 極端に糞便の量が多い、あるいは多量のキャリーオーバー汚染などが原因で反応が進行しない場合があります。 (1)加熱済み懸濁液を滅菌水で 2 倍に希釈し再検査、 (2) プールに含まれる個々の検体を塗抹培養 のいずれかの処置をとります。

[7] 正確な検査を行うためのチップス

（1）<u>試薬をあらかじめ小さいサイズに分注してから使用する</u>
試薬を一度に使い切らない場合は、あらかじめ小さいサイズに分注して使用すると、キャリーオーバー汚染のリスクを低減できます。特にご用意いただく滅菌水は小さいサイズに分注した物を使用し、作業毎に新しい物をご使用することをお勧めします。

（2）<u>サンプルや試薬を室温に放置しない</u>
本製品は非特異的増幅が発生しないように設計されておりますが、長時間室温で放置すると発生するリスクが高くなります。

（3）<u>反応液の調製</u>
反応液の調製はクリーンベンチ内で行うと、キャリーオーバー汚染のリスクを低減できより有効です。

[8] 性能

各種の生菌数を含む陽性糞便からの検出
下表に記載の濃度の対象菌を含む陽性糞便を作製し、培養法および本製品でそれぞれ検出しました。その結果、本製品は培養法に対し、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌 O157 で 100 倍、赤痢菌で 1000 倍の検出感度を示しました。

サルモネラ	生菌数(cfu/g)	0	7x10^{2}	7x10^{3}	7x10^{4}	7x10^{5}	7x10^{6}
	培養法	－	－	－	＋	＋	＋
	本製品 PCR 法	－	＋	＋	＋	＋	＋
O157	生菌数(cfu/g)	0	7 x10^{2}	7 x10^{3}	7 x10^{4}	7 x10^{5}	7 x10^{6}
	培養法	－	－	－	＋	＋	＋
	本製品 PCR 法	－	＋	＋	＋	＋	＋
赤痢菌	生菌数(cfu/g)	0	4 x10^{2}	4 x10^{3}	4 x10^{4}	4 x10^{5}	4 x10^{6}
	培養法	－	－	－	－	＋	＋
	本製品 PCR 法	－	＋	＋	＋	＋	＋

各種の生菌数を含む陽性糞便を陰性糞便とプールしたサンプルからの検出
下表に記載の検査対象菌を含む陽性糞便を作製し、それぞれ表に示された数のプール検体を、陰性糞便検体と合わせて作製しました。その結果、50 検体をプールしても培養法と同等以上の感度で検出することができました。

			プール数									
	生菌数(cfu/g)	培養法	1	10	20	40	50	60	70	80	90	100
サルモネラ	7x10^{2}	－	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－
	7x10^{3}	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	7x10^{4}	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
O157	7x10^{2}	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	7x10^{3}	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	7x10^{4}	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
赤痢菌	4 x10^{2}	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
	4 x10^{3}	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
	4 x10^{4}	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋

[9] トラブルシューティング

トラブル			考えられる要因	対策
内部標準のバンド	標的遺伝子のバンド	標的遺伝子以外のバンド		
なし	**なし**	**なし**	糞便の量が極端に多い	検体懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください
			加熱処理が不十分	ヒートブロックの温度、加熱時間をご確認ください。
			遠心分離が不十分	遠心分離の回転数、時間をご確認ください。
			多量のPCR産物がキャリーオーバー汚染している	上記の対策でも解決しない場合、キャリーオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください
なし または 薄い	**あり**	**なし**	標的遺伝子の増幅量が多い	判定には問題ありません。標的遺伝子(invA, VT, ipaH 遺伝子)の増幅量が多い場合は、内部標準のバンドが見られないまたは薄い場合があります
あり	なし	多くのサンプルで同じ位置にあり	反応液への培養液(糞便液)の持込量が多い	反応液への培養液(糞便液)の持込量が多い場合は非特異増幅が見られる場合があります 前処理済み懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください
あり	なし	多くのサンプルで同じ位置にあり	PCR産物がキャリーオーバー汚染している	キャリーオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください